



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CAMPUS II – AREIA-PB  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**ISABELA REGINA FERREIRA DE LIMA**

**UTILIZAÇÃO DA ÁGUA DE COCO EM PÓ, DILUIDOR DE KENNEY, LEITE UHT  
E TRIS-GEMA DE OVO NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE CÃES**

**AREIA  
2020**

**ISABELA REGINA FERREIRA DE LIMA**

**UTILIZAÇÃO DA ÁGUA DE COCO EM PÓ, DILUIDOR DE KENNEY, LEITE UHT  
E TRIS-GEMA DE OVO NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE CÃES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito parcial à obtenção do título de  
Bacharel em Medicina Veterinária pela  
Universidade Federal da Paraíba.

**Orientador:** Profa. Dra. Norma Lúcia de  
Souza Araújo

**AREIA  
2020**

**Catálogo na publicação Seção de  
Catálogo e Classificação**

L732u Lima, Isabela Regina Ferreira de.

Utilização da água de coco em pó, diluidor de kenney,  
leite UHT e tris-gema de ovo na criopreservação de sêmen  
de cães / Isabela Regina Ferreira de Lima. - Areia, 2020.

31 f. : il.

Orientação: Norma Lúcia de Souza Araújo.  
Monografia (Graduação) - UFPB/CCA.

1. Espermatozoides. 2. Acrossomo. 3. Reprodução. I.  
Araújo, Norma Lúcia de Souza. II. Título.

UFPB/CCA-AREIA

**ISABELA REGINA FERREIRA DE LIMA**

**UTILIZAÇÃO DA ÁGUA DE COCO EM PÓ, DILUIDOR DE KENNEY, LEITE UHT  
E TRIS-GEMA DE OVO NA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN DE CÃES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito parcial à obtenção do título de  
Bacharel em Medicina Veterinária pela  
Universidade Federal da Paraíba.

Aprovado em: 22/04/2020.

**BANCA EXAMINADORA**



---

Profa. Dra. Norma Lúcia de Souza Araújo (Orientador)  
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



---

Prof. Dr. Alexandre José Alves (Examinador)  
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)



---

Prof. MSc. Marquiliano Farias de Moura (Examinador)  
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

À minha família, pela dedicação, companheirismo e amizade, DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu guia e minha força desde meu nascimento.

Aos meus pais, Shoila Regina Ferreira e Luiz Gonzaga de Lima, e à minha irmã Isadora Maria, por todo apoio, amor, carinho e presença, mesmo distantes.

Aos meus avós, tios e primos, por compor meu pilar emocional, importantíssimo nessa caminhada.

À minha tia, Ivonete Ferreira (*in memoriam*), por sempre estimular a realização dos meus sonhos.

À minha digníssima orientadora, Profa. Dra. Norma Lúcia de Souza Araújo, por ter aberto as portas para inúmeras oportunidades e ter me oferecido todo o suporte teórico-prático para abraçá-las, além de ter se tornado uma grande amiga.

Aos integrantes da banca avaliadora, Prof. MSc. Marquiliano Farias de Moura e Prof. Dr. Alexandre José Alves, por terem aceitado compor uma parte fundamental desse trabalho e por todo auxílio durante minha graduação.

Aos tutores, Luís Fernando, Mariana, Adelson e Matheus, pela paciência e disponibilização dos animais utilizados nesse experimento.

À Letícia Nunes, pelo companheirismo, paciência, suporte e por sempre dividir alegrias e dores ao meu lado.

À M.V Kaliane Costa, irmã que a graduação me deu, pela amizade, ensinamentos e conselhos, como também à sua família, pelo acolhimento e carinho.

À Deborah e família, pelo apreço, carinho, cuidado e apoio de sempre, além de todo o suporte durante todos esses anos de graduação.

À M.V Jordanna Almeida, pela amizade, ensinamentos, conselhos e pelos inúmeros jantares após dias difíceis.

Ao meu amigo, M.V Vital Henrique, por todos os momentos, dentro e fora da universidade, que pudemos aprender e praticar lado a lado.

A Xavier, pelo companheirismo e auxílio em todos os momentos, independente da dificuldade, sendo meu parceiro de todas as horas.

Ao M.V Lucas Carvalho, pela amizade, por ter dividido dificuldades e alegrias comigo, pelas noites em claro que passamos estudando durante toda a graduação e por toda assistência que me foi dada.

Aos meus amigos de turma, em especial, Wellington, Joyce, Bianca, Raquel Costa, Raquel Luna, Maria Eduarda, André, Letícia Travassos, Vanessa, Jacilene, Felipe, Amanda,

Alanny, Kamilla, Anderson, entre outros, por compartilharem comigo esses anos da graduação e pela ajuda além da sala de aula.

A Wiliany, Mayara e Breno, pela amizade, companheirismo e amparo em todos os momentos por nós vividos.

Aos integrantes do grupo de Reprodução Animal, Sauane, Bianca Amorim, Gisley e Rafael, pela amizade, troca de conhecimentos e reforço na execução desse trabalho.

Aos meus amigos, que, mesmo distantes, participaram significativamente dessa conquista.

Aos professores, residentes do Hospital Veterinário de Areia/PB e funcionários de toda universidade, por terem contribuído sobremaneira com a minha formação acadêmica.

## RESUMO

Os estudos voltados ao desenvolvimento de metodologias que preservem a qualidade do sêmen são fundamentais para a melhoria das técnicas de inseminação artificial que, por sua vez, é uma ferramenta importante no auxílio do melhoramento da genética e da manutenção de espécies ameaçadas. Objetivou-se avaliar a qualidade do sêmen canino refrigerado com quatro diluidores: ACP- 106®, Kenney, Leite UHT desnatado e Tris-gema de ovo. Foram utilizadas amostras de sêmen de três cães SRD, adultos, colhidas com intervalo semanal e divididas em quatro partes, sendo uma diluída com cada tipo de diluidor e, por fim, refrigerado. A motilidade progressiva, vigor e a funcionalidade de membrana plasmática foram avaliadas a cada 12h pós refrigeração enquanto as amostras apresentaram viabilidade. Os resultados obtidos demonstraram melhor aproveitamento por parte do diluidor de Kenney, no que se refere à motilidade progressiva, vigor espermático e funcionalidade de membrana, que apresentou maior viabilidade no intervalo de tempo mais longo (48 horas), porém o ACP – 106® e o leite UHT desnatado mostraram ser alternativas viáveis até as 12 horas após refrigeração.

**Palavras-Chave:** Espermatozóides. Acrossomo. Reprodução.



## **ABSTRACT**

Studies focused on methodology development for semen quality preservation are fundamental in the improvement of artificial insemination techniques, which is an important procedure for genetics improvement and endangered species maintenance. The objective was to evaluate the quality of canine semen refrigerated with four extenders: ACP-106®, Kenney, skim UHT milk and egg-yolk Tris. There were used semen samples from three adult mixed-breed dogs, harvested at weekly intervals and divided into four sections, each one diluted in each type of extender, and, finally, refrigerated. The progressive motility, vigor and functionality of the plasma membrane were evaluated every 12 hours after refrigeration until the samples presented viability. The results obtained demonstrated that the Kenney extender has a better use in regards to it's progressive motility, vigor and functionality of the plasma membrane, wich presented the best viability at the longest time interval analysed (48 hours), however ACP-106® and skim UHT milk proved to be viable alternatives until up to 12 hours after refrigeration.

**Keywords:** Sperm. Acrosome. Reproduction.

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1 – Valores médios das características espermáticas observadas no T0 (momento da colheita), em cães SRD.....	18
---	----

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Valores da motilidade progressiva de espermatozoides refrigerados, diluídos em ACP-106®, Kenney e leite UHT desnatado nos diferentes tempos de avaliação do cão SRD 1.....	19
Figura 2 – Valores da motilidade progressiva de espermatozoides refrigerados, diluídos em ACP-106®, Kenney e leite UHT desnatado nos diferentes tempos de avaliação do cão SRD 2.....	19
Figura 3 – Valores da motilidade progressiva de espermatozoides refrigerados, diluídos em ACP-106®, Kenney e leite UHT desnatado nos diferentes tempos de avaliação do cão SRD 3.....	20
Figura 4 – Valores do vigor de espermatozoides refrigerados, diluídos em ACP-106®, Kenney e leite UHT desnatado nos diferentes tempos de avaliação do cão SRD 1.....	21
Figura 5 – Valores do vigor de espermatozoides refrigerados, diluídos em ACP-106®, Kenney e leite UHT desnatado nos diferentes tempos de avaliação do cão SRD 2.....	21
Figura 6 – Valores do vigor de espermatozoides refrigerados, diluídos em ACP-106®, Kenney e leite UHT desnatado nos diferentes tempos de avaliação do cão SRD 3.....	22
Figura 7 – Valores do teste hiposmótico (HOST) de espermatozoides refrigerados, diluídos em ACP-106®, Kenney e leite UHT desnatado nos diferentes tempos de avaliação do cão SRD 1.....	23
Figura 8 – Valores do teste hiposmótico (HOST) de espermatozoides refrigerados, diluídos em ACP-106®, Kenney e leite UHT desnatado nos diferentes tempos de avaliação do cão SRD 2.....	24
Figura 9 – Valores do teste hiposmótico (HOST) de espermatozoides refrigerados, diluídos em ACP-106®, Kenney e leite UHT desnatado nos diferentes tempos de avaliação do cão SRD 3.....	25

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>111</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>122</b>
2.1 ANATOMIA ESPERMÁTICA.....	122
2.2 RESFRIAMENTO DO SÊMEN .....	122
2.3 DILUIDORES DO SÊMEN CANINO .....	133
2.3.1 Água de coco .....	133
2.3.2 Leite desnatado .....	144
2.3.3 Tris-gema de ovo.....	144
2.4 TESTE HIPOSMÓTICO.....	155
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>166</b>
3.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO .....	166
3.2 COLHEITA E AVALIAÇÃO DO EJACULADO.....	166
3.3 DILUIÇÃO DO SÊMEN.....	166
3.4 RESFRIAMENTO DO SÊMEN E AVALIAÇÃO PELO TESTE HIPOSMÓTICO (HOST) .....	177
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>28</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A inseminação artificial (IA) é uma ferramenta importante no auxílio do melhoramento da genética nas criações, por meio da rápida disseminação de material genético de alta qualidade a um custo reduzido, atua também como importante meio no controle de doenças, especialmente as sexualmente transmissíveis e ainda na manutenção das espécies ameaçadas (SOUZA, 1985; SILVA, 2005).

A utilização de técnicas de criopreservação do ejaculado aliados à IA apresentam vantagens, por proporcionar uma maior sobrevivência e melhor viabilidade às células espermáticas, podendo ser utilizado, portanto, o sêmen resfriado ou congelado (ROTA, STRÖM e LINDEFORSBERG, 1995).

Contudo, para obter uma fertilização de sucesso através da inseminação artificial com sêmen criopreservado é necessário o uso de diluidores, que mantenham as características fundamentais das células espermáticas após o processo de criopreservação, que são: manutenção do metabolismo energético, presença de motilidade progressiva, enzimas localizadas no interior do acrossomo essenciais para a penetração dos espermatozoides através das estruturas ao redor do oócito e preservação das proteínas da membrana plasmática (AMANN e PICKET, 1987).

Estudos têm relatado a utilização de meios diluidores variados na criopreservação do sêmen canino. Os primeiros experimentos para a preservação do sêmen canino iniciaram-se com a adaptação empírica de diluentes usados para o resfriamento e congelamento do sêmen de outras espécies com o uso do leite desnatado (MARTIN, 1963), Tris (FOOTE, 1964) e Kenney (DA CUNHA e LOPES, 2000), dentre outros. E tem-se observado uma melhor capacidade de preservação da viabilidade espermática por parte do diluidor à base de Tris-gema de ovo (SILVA, 2007). Além disso, vem sendo observada uma maior frequência no uso do diluidor à base de água de coco em pó (ACP-106®) bem como seu sucesso na espécie canina. (CARDOSO, SILVA e SILVA, 2005)

Com base nesses aspectos, o presente trabalho tem como objetivo comparar a eficiência de diferentes diluidores: água de coco em pó (ACP-106®), Kenney, leite UHT desnatado e Tris-gema de ovo, utilizados na refrigeração de sêmen canino.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ANATOMIA ESPERMÁTICA

Os espermatozoides completamente desenvolvidos são células alongadas, consistindo de uma cabeça achatada contendo o núcleo e de uma cauda com o aparelho necessário para a motilidade celular. O espermatozoide é todo recoberto pelo plasmalema, ou membrana plasmática. O acrossomo, ou capa acrossomal, é uma estrutura de parede dupla situada entre a membrana plasmática e a porção anterior da cabeça. O colo conecta a cabeça do espermatozoide com a cauda (flagelo), que é subdividida em peças intermediária, principal e terminal (HAFEZ e HAFEZ, 2004)

O espermatozoide possui um núcleo altamente condensado; estruturas microtubulares, fibrosas e membranosas. As membranas são compostas por lipídios (fosfolipídios e colesterol, em maioria) e proteínas (periféricas e integrais) dispostas em uma bicamada com a extremidade hidrofílica dos lipídios externamente e as cadeias hidrofóbicas de ácido graxo internamente. Possuem a característica de fluidez, que conferem aos fosfolipídios a capacidade de movimentação lateral, a qual está relacionada diretamente à resistência a mudanças de temperatura. As estruturas membranosas são altamente influenciadas pelas oscilações térmicas, portanto a avaliação da sua integridade e funcionalidade são fundamentais (AMANN e PICKETT, 1987).

### 2.2 RESFRIAMENTO DO SÊMEN

Spallanzani, em 1776, foi o primeiro a registrar que uma diminuição na temperatura proporcionava uma redução, de forma reversível, na atividade metabólica do espermatozoide, permitindo assim o seu armazenamento. Na espécie canina, o primeiro estudo relacionado à criopreservação do sêmen de cães é descrito por Rowson em 1954. A primeira inseminação artificial canina foi realizada por Spallazani, entretanto, com sêmen à fresco (UCHOA *et al.*, 2012).

O espermatozoide é basicamente composto por cabeça, pescoço, peça intermediária, peça principal e peça final. É revestido pela membrana celular, a qual é composta, resumidamente, por uma bicamada lipídica, com uma porção hidrofóbica e outra hidrofílica, proteínas periféricas e proteínas integrais. Essa membrana, à temperatura corporal, possui a capacidade de mover-se lateralmente, habilidade denominada fluidez. Dessa forma, a temperatura é um fator muito importante na manutenção da fluidez da membrana, o que justifica

a necessidade do estabelecimento adequado da taxa de resfriamento na criopreservação. (AMANN e PICKET, 1987).

O sêmen refrigerado à temperatura de 4 a 5°C é o mais recomendado para a utilização na inseminação artificial via transvaginal em cães, pois possui menor custo. É um método prático e permite melhor preservação da fertilidade. Embora, o resfriamento do sêmen seja um processo que menos danifica a motilidade espermática, a limitação para o seu uso é o curto tempo de sobrevivência dos espermatozoides armazenados (SÁNCHEZ, CARTAGENA e BERLAND, 2006).

### 2.3 DILUIDORES DO SÊMEN CANINO

Para prolongar essa sobrevivência espermática durante o processo de criopreservação é necessária a utilização de meios diluidores adequados que sejam de baixo custo, de fácil preparo, que previnam o crescimento de microrganismos, que ofereçam energia, manutenção do pH e osmolaridade à célula espermática, proteção da integridade do acrossomo e membrana plasmática, além da diminuição do metabolismo dos espermatozoides, e também da proteção contra choque térmico quando do armazenamento do sêmen a baixas temperaturas (AMANN e PICKET, 1987; ROTA, STRÖM e LINDE-FORSBERG, 1995; SANTOS, ALMEIDA e QUEIROZ, 2002; ALVARENGA *et al.*, 2013).

#### 2.3.1 Água de coco

Na biotecnologia da reprodução, a água de coco apresenta características que a classificam como um bom diluente de sêmen, já tendo sido utilizada com sucesso em várias espécies, inclusive na espécie canina (CARDOSO, SILVA e SILVA, 2018).

A composição básica da água de coco é de 95,5% de água, 4% de carboidratos, 0,1% de gordura, 0,02% de cálcio, 0,01% de fósforo, 0,5% de ferro, além de aminoácidos, vitamina C, vitaminas do complexo B e sais minerais. Possui natureza muito perecível a temperaturas elevadas, danos mecânicos, manuseio inadequado e a condições impróprias de armazenamento (BARROS e TONIOLLI, 2011), condições que tornam os diluidores à base de água de coco *in natura* pouco vantajosos, situação ainda agravada pela baixa disponibilidade dos frutos com característica ideais para a sua fabricação e a impossibilidade de conservação por longo período. Além disso, a constituição bioquímica pode variar de um fruto para outro, o que pode diretamente influenciar a ação conservativa do diluidor. Diante dessa problemática, novas pesquisas foram conduzidas no intuito de desenvolver a água de coco sob a forma de pó (ACP® - ACP Tecnologia, Brasil), a qual apresenta os mesmos constituintes bioquímicos da forma *in*

*natura*, porém é padronizada e mais eficazmente conservada, o que facilita sua comercialização para regiões onde o fruto não existe (SILVA, CARDOSO e SILVA, 2006).

### 2.3.2 Leite desnatado

Os diluentes à base de leite desnatado têm um desempenho aceitável *in vitro* e *in vivo* para a preservação do sêmen no estado líquido. O diluidor à base de leite desnatado, glicose, penicilina e estreptomicina, desenvolvido por Kenney e colaboradores no ano de 1975 tem servido como referência para o desenvolvimento de diluidores de sêmen para as diversas espécies no mundo (OLIVEIRA NETO, 2012).

O leite em pó é desprovido de lipoproteínas, mas também protege a célula espermática durante o armazenamento. Estudos indicam que os componentes ativos presentes no leite capazes de proteger o espermatozoide são as micelas de caseína, que interagem com as proteínas BSP, as quais podem causar a retirada de fosfolipídios e colesterol da membrana plasmática (PUGLIESSI, 2009).

O leite UHT desnatado também é utilizado como diluente para refrigeração de sêmen e possui uma capacidade de conservação superior em relação aos outros tipos de leite, devido à alta temperatura empregada no seu processamento e às baixas concentrações de lipídeos presentes na sua composição. Esses fatores favorecem a durabilidade da amostra por desnaturação da lactoalbumina e pela diminuição da aglutinação espermática, respectivamente (CASTRO, 2014).

Várias são as modificações na estrutura do leite, induzidas pelo tratamento térmico: o diâmetro das micelas de caseína aumenta, proteínas do soro e enzimas são parcialmente desnaturadas, grupos sulfídrilas (SH) são liberados e a concentração de minerais decresce pela adsorção de íons nas micelas de caseína. No entanto, a desnaturação enzimática parece ser a modificação mais importante no leite, explicando a diferença de sobrevivência espermática entre o leite cru e o leite UHT. Tal confirmação veio pela observação de que o aquecimento afetou somente as frações contendo proteínas solúveis (BATTELIER *et al.*, 1997).

### 2.3.3 Tris-gema de ovo

O Tris (Tris-hidroximetil-aminometano –  $\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$ ) é uma substância facilmente solúvel em água e disponível comercialmente com alto grau de pureza na forma de cristais. Atua como tampão iônico bipolar em pH entre 7,0 e 9,0 (SILVA, 2005).

O ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico –  $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$ ) é um componente do diluente Tris utilizado na forma monohidratada. É provável que o ácido cítrico



auxilie na preservação da célula espermática, ajudando na manutenção do pH do diluente, atuando como antioxidante, bem como na respiração celular (SILVA, 2005; SILVA, 2007 MARTINS, 2018).

A gema de ovo de galinha tem sido comumente adicionada ao tampão Tris por proteger a membrana plasmática, restaurando os fosfolipídios perdidos durante o choque térmico, decorrente da mudança de temperatura que ocorre durante o resfriamento inicial do sêmen. Sugere-se que essa proteção possa ser devido à ação de uma lipoproteína chamada fosfatidilcolina (SILVA, 2005). Além de agir na proteção da membrana plasmática, a gema de ovo também é conhecida por ser uma fonte proteica para o diluente. Uma variedade de concentrações de gema de ovo tem sido utilizada para preservação de sêmen canino de acordo com a capacidade tamponante dos outros componentes do diluente, sendo que a concentração de gema mais utilizada é em torno de 20% do diluente (MARTINS, 2005).

Além dos seus benefícios, a gema apresenta seus aspectos negativos, como a possibilidade de transmissão de doenças e também facilita o processo de oxidação sobre os espermatozoides caninos, permitindo peroxidação dos lipídios insaturados, à qual o espermatozoide canino é muito sensível (SILVA, 2005).

## 2.4 TESTE HIPOSMÓTICO

O teste hiposmótico permite avaliar a funcionalidade da membrana plasmática do espermatozoide, observando as alterações morfológicas sofridas pelos espermatozoides quando expostos a condições hipotônicas (aumento de tamanho dos flagelos ou curvatura dos mesmos). (CBRA, 2013). Esse teste apresenta como princípio a observação de que um espermatozoide, com uma membrana celular íntegra, se colocado em solução hiposmótica, permite a passagem da água pela membrana celular até o restabelecimento do equilíbrio osmótico entre os fluidos extras e intracelulares (SANTOS, TORRES e FONSECA, 2001).

Em condições fisiológicas, a fertilização não ocorre se a membrana plasmática do espermatozoide é bioquimicamente inativa, mesmo quando permanece estruturalmente intacta; portanto, o teste hiposmótico é um indicador mais preciso do que os corantes especiais (SANCHEZ, RUBILAR e GATICA, 2002).

O teste hiposmótico (HOST) deve ser considerado um indicador de fertilidade, uma vez que a integridade da membrana plasmática é indispensável para que ocorra fecundação (MELO, 1999).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS E LOCAL DO EXPERIMENTO

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal, localizado no Hospital Veterinário do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal da Paraíba, Campus de Areia, durante o período de novembro de 2019 a fevereiro de 2020. Foram utilizados três cães SRD, adultos, conhecidamente férteis e livres de enfermidades.

#### 3.2 COLHEITA E AVALIAÇÃO DO EJACULADO

Foram realizadas três colheitas de sêmen por cada animal, com intervalo semanal. O sêmen foi coletado pelo método de manipulação digital, em um tubo graduado, estéril, previamente aquecido a 37 °C. A fração rica em espermatozoides de cada ejaculado foi coletada e avaliada macroscopicamente quanto ao volume, cor e aspecto.

Para a análise microscópica, uma alíquota contendo 10 microlitros de cada ejaculado foi colocada na lâmina de microscopia, sob lamínula e assim prosseguiu a avaliação quanto à motilidade progressiva (numa escala de 0 a 100%), vigor (numa escala de 0 a 5), em microscopia óptica, com objetiva de 10x. As alterações morfológicas foram determinadas, em preparação úmida, com o auxílio de microscopia óptica, em aumento de 100x com imersão, contando-se 100 células.

Por fim, outra alíquota de 10 microlitros de sêmen fresco foi incubada num frasco contendo 1mL de solução de formol salino para posterior avaliação de concentração espermática utilizando-se a câmara de Neubauer.

#### 3.3 DILUIÇÃO DO SÊMEN

Após a colheita e avaliação do ejaculado, o mesmo foi dividido em quatro frações, na proporção 1:1, nos quatro diluidores diferentes, para ser assim serem testados. Os diluidores utilizados foram a água de coco em pó (ACP – 106®), o diluidor de Kenney, o leite UHT desnatado e o Tris-gema de ovo. As amostras de sêmen diluídas foram acondicionadas em tubos do tipo Falcon.

### 3.4 RESFRIAMENTO DO SÊMEN E AVALIAÇÃO PELO TESTE HIPOSMÓTICO (HOST)

As amostras de sêmen diluído foram armazenadas no refrigerador a uma temperatura entre 4 °C e 5 °C, onde permaneceram para as avaliações pelo teste hiposmótico, até enquanto os espermatozoides apresentavam motilidade. Também foram mantidos no refrigerador, sob a mesma temperatura a solução hiposmótica, que foi mantida em frascos do tipo eppendorf, contendo 0,5 mL da solução hiposmótica.

Seguidas 12 horas da refrigeração, retirou-se uma alíquota contendo 30 microlitros do sêmen diluído em cada diluidor para ser encubada em 0,5mL de solução hiposmótica. As amostras de sêmen diluído encubadas na solução hiposmótica permaneceram, durante trinta minutos, em banho maria, numa temperatura de 37 °C e, logo em sequência, as amostras foram submetidas à primeira análise do teste hipomótico (HOST), por meio da contagem de 100 células, denominada tempo zero (T0) em microscopia óptica, contando 100 células na objetiva de 100x. Assim, a cada 12 horas, foi realizado um teste hiposmótico, até não haver detecção de motilidade espermática na amostra avaliada, seguindo o que foi proposto por Varela Jr., (2005).

Os espermatozoides com de cauda dobrada, em qualquer grau, foi considerado como apresentando membrana funcional. Para evitar erros de interpretação, foram descontadas de cada amostra, o percentual de espermatozoides contendo cauda dobrada após a avaliação da morfologia espermática.

Paralelamente, o ejaculado mantido sob refrigeração nos quatro diferentes diluidores também foi avaliado microscopicamente quanto à motilidade progressiva (numa escala de 0 a 100%) e vigor (numa escala de 0 a 5). As avaliações de motilidade progressiva e vigor prosseguiram da seguinte forma: uma alíquota de 10 microlitros de cada amostra foi colocada em uma lâmina sob lamínula, previamente aquecidas, e analisadas com o auxílio de microscopia óptica, com objetiva de 10x, a cada 12 horas, juntamente ao teste hiposmótico, no intuito de verificar o tempo de viabilidade espermática da amostra.

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios de volume, concentração espermática, vigor espermático e defeitos espermáticos totais obtidos na avaliação do sêmen de cães SRD, estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1- Valores médios das características espermáticas observadas no T0 (momento da colheita), em cães SRD.

<b>Características espermáticas</b>	<b>Animal 1</b>	<b>Animal 2</b>	<b>Animal 3</b>
Volume (mL)	4	4	3
Concentração ( $\times 10^6$ )	147,5	72,5	62,5
Motilidade (0-100%)	70	70	60
Vigor (0-5)	4	4	3
Defeitos totais (%)	10%	8%	15%

No tempo zero (T0), imediatamente após a colheita, com o sêmen *in natura*, as variáveis volume de sêmen, concentração espermática, motilidade progressiva, vigor espermático e defeitos espermáticos totais apresentaram valores semelhantes nos animais avaliados. Apenas o animal 3 apresentou resultado numericamente inferior para todos os aspectos avaliados, o que pode ser explicado como sendo uma característica reprodutiva inerente ao animal em questão, quando em comparação aos demais utilizados neste estudo.

Os resultados quanto à motilidade progressiva utilizando os diluidores ACP-106®, Kenney, leite UHT desnatado e Tris-gema de ovo, em sêmen refrigerado de cães SRD referente aos diferentes tempos de avaliação, estão demonstrados nas figuras de 1 a 3, respectivamente para os três animais utilizados neste experimento.

Como pode ser observado nas figuras 1, 2 e 3, respectivamente, o ACP-106® foi numericamente superior no tocante à análise de motilidade progressiva quando avaliado nas primeiras 12 horas pós colheita, com valores de 70%, contra os 66,7%, ambos para o Kenney e leite UHT desnatado, no animal 1. De modo semelhante, comportou-se o ejaculado do animal 2, cuja motilidade da alíquota diluída em ACP-106® foi numericamente superior nas primeiras 12 horas de avaliação (60%) àquela diluída no diluidor de Kenney (56,7%) e no leite UHT desnatado (13,3%). Por sua vez, o animal 3 apresentou resultados numericamente iguais (40%)

no que se referiu à motilidade à avaliação pós 12 horas de refrigeração, quando diluído em ACP-106® ou meio de Kenney.

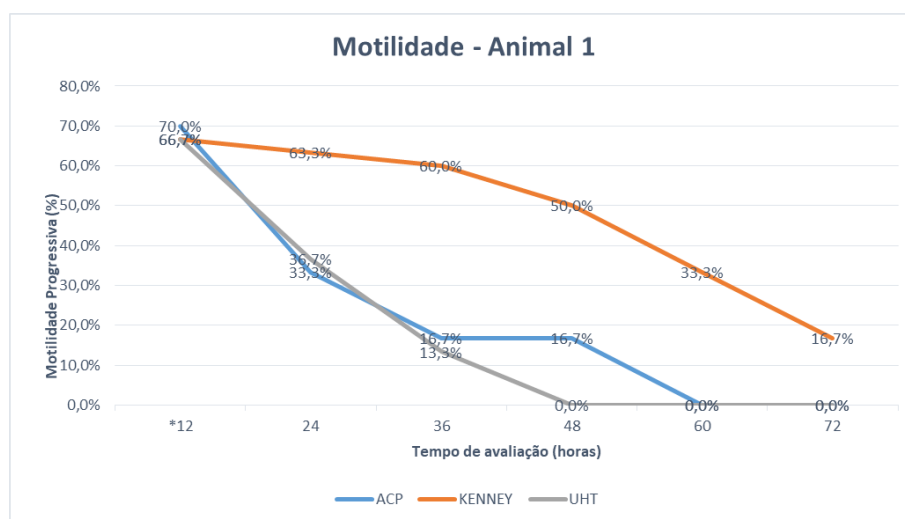


Figura 1- Valores da motilidade progressiva de espermatozoides refrigerados, diluídos em ACP-106®, Kenney e leite UHT desnatado nos diferentes tempos de avaliação do cão SRD 1.

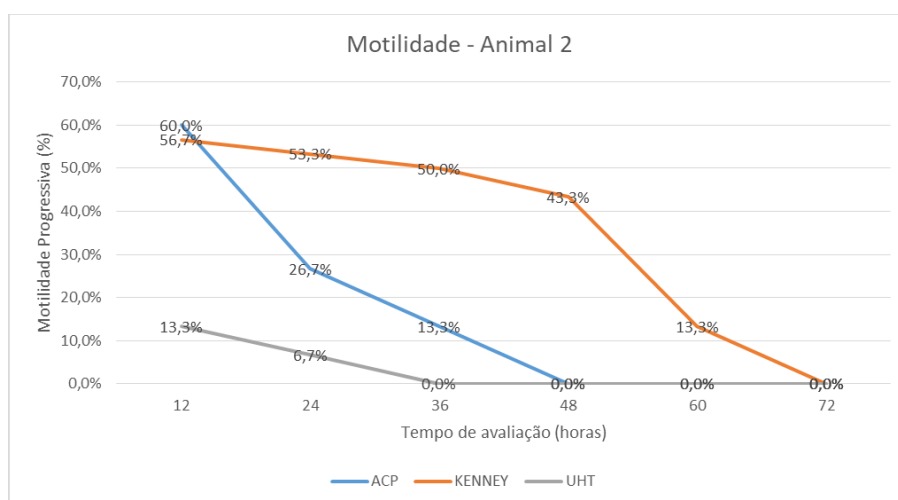


Figura 2- Valores da motilidade progressiva de espermatozoides refrigerados, diluídos em ACP-106®, Kenney e leite UHT desnatado nos diferentes tempos de avaliação do cão SRD 2.

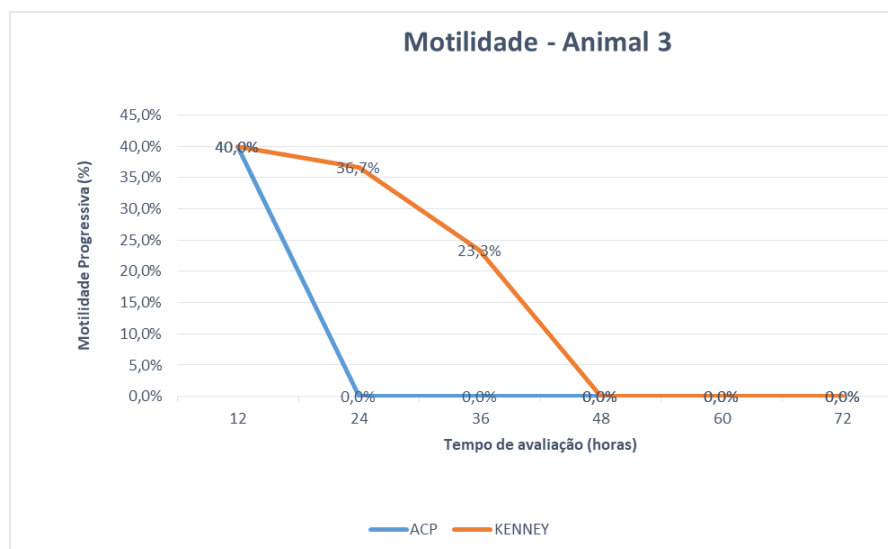


Figura 3- Valores da motilidade progressiva de espermatozoides refrigerados, diluídos em ACP-106®, Kenney e leite UHT desnatado nos diferentes tempos de avaliação do cão SRD 3.

Ainda de acordo com os dados observados nas figuras 1, 2 e 3, pode-se observar que, apesar do ACP-106®, nas primeiras 12 horas de refrigeração demonstrar aparente superioridade em relação aos demais diluidores avaliados, a partir da segunda análise (24 horas pós colheita), o diluidor de Kenney permaneceu soberano e, na maioria das avaliações, foi capaz de manter as amostras de sêmen viáveis por um período de até 48 horas, com as amostras de dois dos três animais avaliados, mantendo índices de motilidade progressiva superior aos 40% mínimos descritos por Linde-Forsberg, Holst e Govette (1999) como aceitáveis para a inseminação artificial com sêmen resfriado na espécie canina.

Os resultados referentes ao diluente Kenney quanto à motilidade aqui encontrados sugerem, portanto, que os componentes desse diluente têm uma maior capacidade de proteção às células espermáticas frente ao choque térmico do processo de refrigeração, assim como o que foi descrito por Pignataro, (2015).

As amostras de sêmen diluídas no diluidor Tris gema dos três animais avaliados neste estudo, após as primeiras 12 horas de resfriamento não apresentaram motilidade progressiva, portanto, a motilidade zero não aparece nas figuras.

Os resultados relativos ao vigor espermático obtidos na avaliação da eficiência dos diluidores ACP-106®, Kenney, leite UHT desnatado e Tris-gema de ovo, em sêmen refrigerado dos três animais avaliados neste estudo estão demonstrados nas figuras 4, 5 e 6 e apresentam-

se semelhantes àqueles da motilidade progressiva, quando relacionados aos diluidores avaliados.

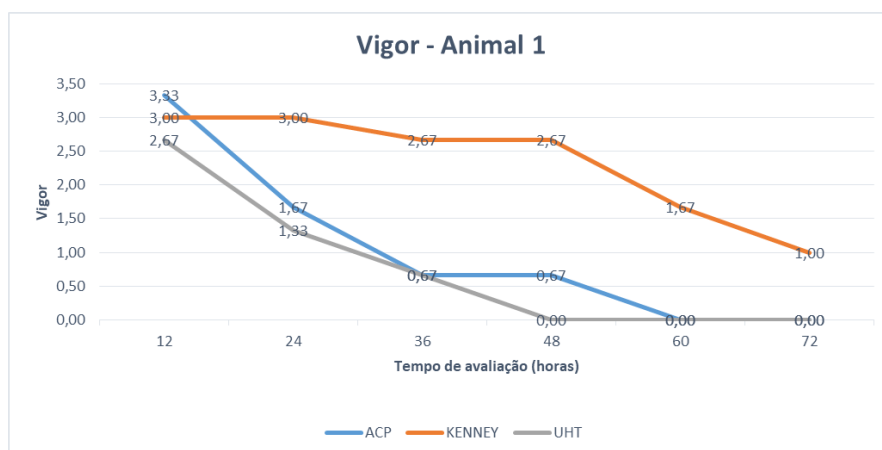


Figura 4- Valores do vigor de espermatozoides refrigerados, diluídos em ACP-106®, Kenney e leite UHT desnatado nos diferentes tempos de avaliação do cão SRD 1.

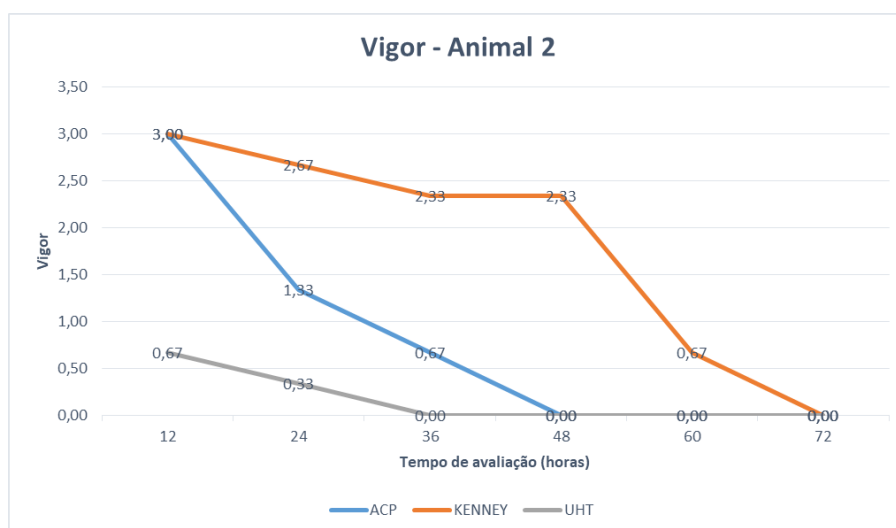


Figura 5- Valores do vigor de espermatozoides refrigerados, diluídos em ACP-106®, Kenney e leite UHT desnatado nos diferentes tempos de avaliação do cão SRD 2.

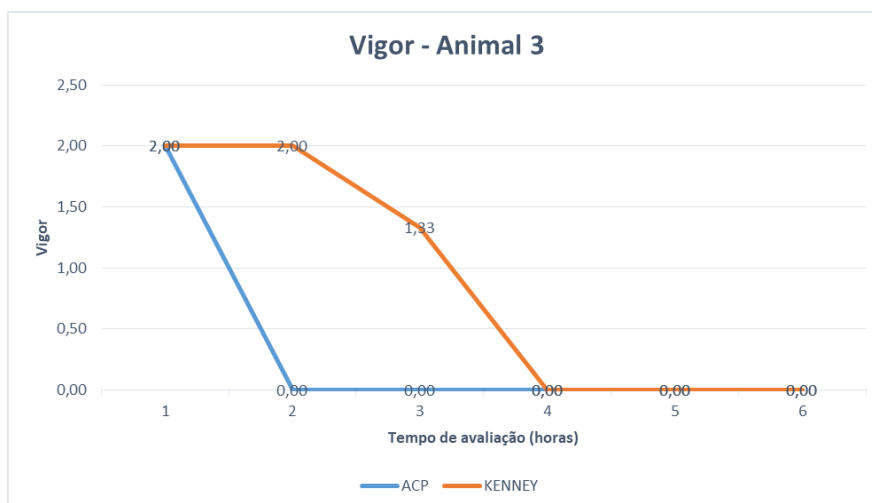


Figura 6- Valores do vigor de espermatozoides refrigerados, diluídos em ACP-106®, Kenney e leite UHT desnatado nos diferentes tempos de avaliação do cão SRD 3.

Nas primeiras 12 horas de resfriamento, os espermatozoides diluídos em ACP-106® apresentaram-se numericamente, superiores ou iguais ao diluidor de Kenney, sendo os valores de 3,33; 3,0 e 2,0 o vigor das amostras de sêmen diluídas em meio ACP-106® e 3,0; 3,0 e 2,0 o vigor das amostras de sêmen diluídas em meio de Kenney nos animais 1, 2 e 3, respectivamente, conforme demonstrado nas figuras 4, 5 e 6.

No entanto, semelhantemente ao que ocorreu com a motilidade progressiva, após as primeiras 12 horas do resfriamento, houve uma mudança nesse padrão e o diluidor de Kenney passou, então, a demonstrar melhor resultado em relação ao vigor espermático nos três animais avaliados nesse estudo.

Bouchard *et al.*, (1990) estudaram as características do sêmen de cães mantido a 4°C, utilizando dois meios diluidores: leite desnatado/glicose ou citrato gema de ovo. O sêmen foi avaliado a cada seis horas, até 120 horas. O meio contendo leite desnatado foi superior ao citrato/gema, na maioria das observações, na manutenção da motilidade espermática, estando de acordo com os resultados obtidos neste estudo.

Por outro lado, em outro estudo, utilizando sêmen canino refrigerado (4°C) diluído em TRIS-gema ou leite desnatado, Messias (2000), obteve resultado superior do TRIS-gema em comparação ao leite desnatado. O tempo de viabilidade do sêmen, que apresentou mínimo de 50% de motilidade progressiva com os referidos diluentes foi: TRIS-gema 82,5 horas; leite



desnatado 60,7 horas; TRIS – gema acrescida de secreção prostática 60,3 horas; leite desnatado acrescido de secreção prostática 38,4 horas.

Neste estudo, entretanto, os resultados obtidos constatarem que o diluidor Tris – gema de ovo obteve o pior rendimento dentre os demais, visto que as amostras diluídas nesse diluidor não apresentaram motilidade após 12 horas, diferente do que foi observado em outros estudos (ROTA, STRÖM e LINDE-FORSBERG 1995; SILVA, CARDOSO e SILVA, 2006). Possivelmente isso ocorreu devido a capacidade do Tris – gema de ovo de aumentar a probabilidade de danos causados pela peroxidação (SILVA, 2005; SILVA, 2007), e à composição da gema de ovo que pode ser influenciada por diversos fatores como a própria alimentação da galinha que pode determinar a quantidade de HDL (lipoproteína de alta densidade) e LDL (lipoproteína de baixa densidade) na gema (PRAPAIWAN *et. al.*, 2016).

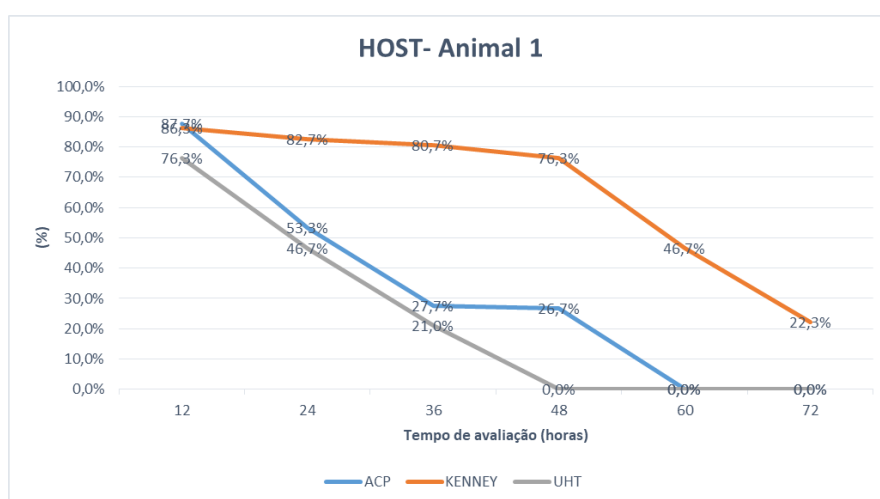


Figura 7- Valores do teste hiposmótico (HOST) de espermatozoides refrigerados, diluídos em ACP-106®, Kenney e leite UHT desnatado nos diferentes tempos de avaliação do cão SRD 1.

Os resultados referentes ao HOST utilizando os diluidores ACP-106®, Kenney, leite UHT desnatado e Tris-gema de ovo, em sêmen refrigerado de cães SRD nos diferentes tempos de avaliação, estão demonstrados nas figuras de 7, 8 e 9, respectivamente para os três animais utilizados neste experimento.

De acordo com os dados demonstrados na figura 7, no animal 1, o percentual de espermatozoides diluídos em ACP – 106® que se mostrou reagente ao teste foi 87,7%; 53,3%;

27,7% e 26,7%, às 12, 24, 36, e 48 horas, respectivamente. Para as amostras diluídas em meio de Kenney, o percentual de espermatozoides que se mostrou reagente ao teste foi 86,3%; 82,7%; 80,7% e 76,3%, às 12, 24, 36, e 48 horas, respectivamente. Já para as amostras diluídas em meio de UHT, o percentual de espermatozoides que se mostrou reagente ao teste foi 76,3%; 46,7% e 21%, às 12, 24 e 36 horas, respectivamente.

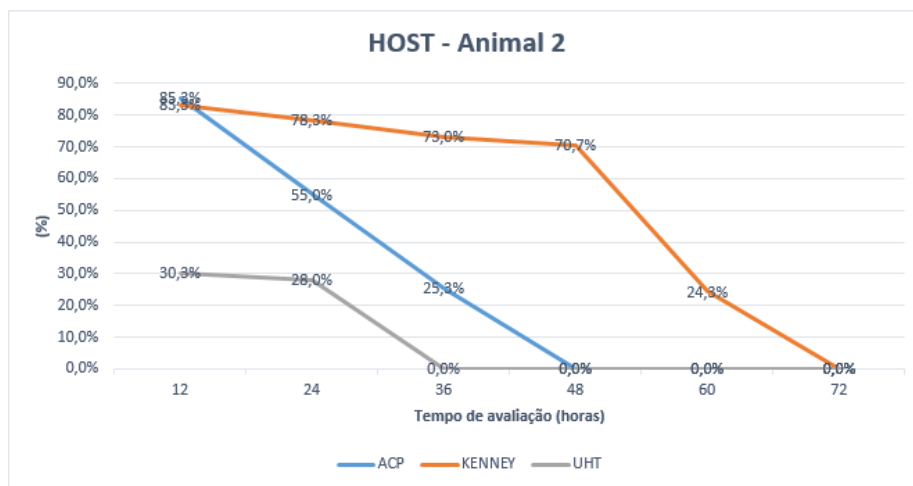


Figura 8- Valores do teste hiposmótico (HOST) de espermatozoides refrigerados, diluídos em ACP-106®, Kenney e leite UHT desnatado nos diferentes tempos de avaliação do cão SRD 2.

Os dados na figura 8 indicam que no animal 2 também houve uma superioridade numérica no tocante ao percentual de espermatozoides diluídos em ACP – 106®, que se mostrou reagentes ao teste (85,3%) às 12 horas, sendo os demais: 55,0%; 27,7% e 25,3%, às 12, 24, 36, e 48 horas, respectivamente. Neste caso, as amostras diluídas em meio de Kenney, tiveram maior tempo de sobrevivência, com os seguintes percentuais de espermatozoides que se mostraram reagentes ao teste: 83,3%; 78,3%; 73,0%; 70,7% e 24,6%, às 12, 24, 36, 48 e 60 horas, respectivamente. Já para as amostras diluídas em meio de UHT, o percentual de espermatozoides que se mostrou reagente ao teste foi 30,3% e 28,0%, às 12 e 24 horas, respectivamente.

Por sua vez, no animal 3 (figura 9), as amostras diluídas em meio ACP – 106® mostraram-se reagentes ao teste (40,7%) até às 12 horas e as diluídas em meio Kenney também tiveram maior tempo de sobrevivência, com os seguintes percentuais de espermatozoides que se mostraram reagentes ao teste: 50,0%; 45,7% e 41,7%, às 12, 24 e 36 horas, respectivamente.

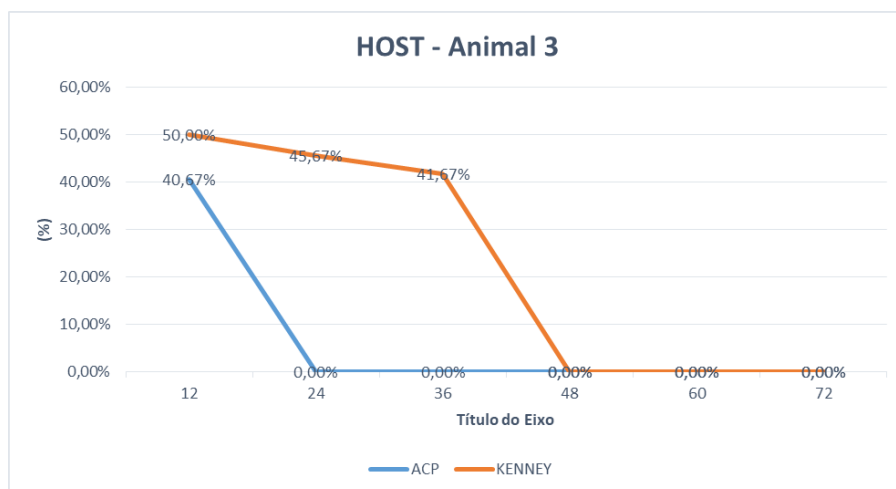


Figura 9- Valores do teste hiposmótico (HOST) de espermatozoides refrigerados, diluídos em ACP-106®, Kenney e leite UHT desnatado nos diferentes tempos de avaliação do cão SRD 3.

Comparando os resultados de motilidade e de resposta positiva ao HOST no presente trabalho foi possível observar que esses dois parâmetros são relacionados, corroborando com o estudo de Martinez, (2004). Portanto, evidenciou-se a importância de associar o HOST à motilidade progressiva na avaliação espermática na criopreservação do sêmen canino, assim como foi também relatado por Sánchez, Cartagena e Berland (2006) e Santos, Torres e Fonseca (2001).

Observa-se que, independentemente do diluente adicionado, à medida que aumenta o tempo de armazenamento, a motilidade e o vigor, bem como a funcionalidade da membrana espermática mensurada pelo HOST, diminuem, e são reflexos dos produtos do metabolismo espermático conforme descrito por Oliveira Neto, (2012). Esses resultados demonstram que os espermatozoides sofreram alteração de membrana plasmática durante o resfriamento, à medida que o tempo foi passando, o que era esperado, devido aos danos causados à membrana espermática em razão do resfriamento e, quando comparamos o desempenho dos diluidores frente à esses danos causados pela criopreservação, observamos que, a despeito dos resultados às 12 horas, quando esse tempo é estendido, o meio de Kenney consegue proporcionar uma maior crioproteção à membrana celular, o que explicaria o maior tempo de sobrevivência das amostras nesse meio nos três animais avaliados no presente estudo.

A análise de funcionalidade de membrana exposta pelo resultado obtido com o teste hiposmótico manteve-se superior a 60% nas amostras diluídas que possuíam motilidade, assim

como o observado por Sánchez, Cartagena e Berland (2006) que, com essa justificativa, indicaram o uso dos respectivos diluidores na preservação do sêmen canino refrigerado e sua posterior utilização na inseminação artificial.

Pugliesi, 2009 defende que a tecnologia de resfriamento do sêmen é interessante quando sua capacidade fertilizante é preservada por um a dois dias, o que foi observado por parte do diluidor de Kenney na maioria das coletas. O autor também justifica que o vigor dos espermatozoides diluídos em meio de Kenney não só foi superior, como também se manteve constante comparado aos demais, possivelmente pela maior disponibilidade de ATP para a célula espermática advinda principalmente da utilização de glicose presente na formulação desse diluidor (4,9g/100mL).

No presente estudo, verificou-se que o tempo médio de sobrevivência das amostras com um padrão de motilidade progressiva em torno de 40% foi de 48 horas, esses valores são diferentes dos encontrados em outros estudos com sêmen resfriado de cães utilizando diluidores à base de leite desnatado e TRIS-gema (BOUCHARD *et al.*, 1990; LINDE-FORSBERG, HOLST e GOVETTE, 1999; VERSTEGEN *et al.*, 2005). Nesses estudos a motilidade foi mantida até, em média, 10 dias.

Os meios contendo gema de ovo e leite desnatado preservam a qualidade espermática e previnem a precoce reação do acrossomo, podendo preservar uma boa viabilidade de refrigeração, desde que a temperatura seja mantida sem oscilações, o que pode explicar a diferença de resultado obtida neste estudo.

O refrigerador aqui utilizado, apresentou, por diversas ocasiões, problemas na curva de resfriamento que foi inicialmente programada para 0,32 graus/ min. E no decorrer do resfriamento de várias coletas, houve variação. Também houve falhas na manutenção da temperatura de resfriamento da geladeira, após a mesma atingir os 4 ou 5°C da temperatura de resfriamento, fazendo com que essa temperatura oscilasse e, em muitas situações, a mesma chegava aos 2,5°C durante a noite. Essas variações na temperatura, efetivamente, interferiram negativamente na sobrevivência das amostras de sêmen e, por sua vez, na capacidade crioprotetora de todos os diluidores avaliados no presente estudo.

## 5 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos e de acordo com as condições deste estudo pode-se concluir que:

No que se refere à motilidade progressiva, vigor espermático e funcionalidade de membrana, o diluidor que apresentou maior viabilidade no intervalo de tempo mais longo (48 horas), foi o diluidor de Kenney.

A água de coco em pó (ACP-106®) e o leite UHT desnatado se mostraram como alternativas satisfatórias para uso na inseminação artificial em até 12 horas após colheita.

## REFERÊNCIAS

ALVARENGA, M. *et al.* Suplementação do meio de refrigeração espermática com vitamina C e catalase em sêmen obtido de cães jovens e idosos. **Veterinária e Zootecnia**, p. 673-682, 2013.

BARROS, T. B.; TONIOLLI, R. Uso potencial da água de coco na tecnologia de sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal, Belo Horizonte**, v.35, n.4, p.400-407, 2011.

BATELLIER, F. *et al.* Effect of milk fractions on survival of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 48, n. 3, p. 391-410, 1997.

BOUCHARD, G. F. *et al.* Effect of storage temperature, cooling rates and two different semen extenders on canine spermatozoal motility. **Theriogenology**, v. 34, p. 147-157, 1990.

CARDOSO, R. C. S.; SILVA, A. R.; SILVA, L. D. M. Use of the powdered coconut water (ACP-106®) for cryopreservation of canine spermatozoa. **Animal Reproduction (AR)**, v. 2, n. 4, p. 257-262, 2018.

CASTRO, F. S. **Comparação entre diferentes tipos de leites como diluentes para sêmen equino refrigerado**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2014.

CBRA – Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3. ed. CBRA. Belo Horizonte-MG, p. 89, 2013.

DA CUNHA, I. C. N.; LOPES, M. D. Estudo da viabilidade do processo de refrigeração do sêmen canino, utilizando-se diluidores à base de leite e glicina gema. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 3, n. 1, p. 37-42, 2000.

FOOTE, R. H. Extenders for freezing dog semen. **Am J Vet Res**, v.25, p.37-40, 1964.

HAFEZ, E. S. E; HAFEZ, B. **Reprodução animal**. 7. ed. São Paulo, p 97, 2004.

KENNEY, R.M. *et al.*, Minimal contamination techniques for breeding mares: technique and preliminary findings. In: Annual Convention **American Association Equine Practitioners**. p.327, 1975.

KLEIN, B. G. **Cunningham tratado de fisiologia veterinária**. Elsevier Brasil, p. 451, 2014.

LINDE-FORSBERG, C; HOLST, B. S; GOVETTE, G. Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. **Theriogenology**, v. 52, n. 1, p. 11-23, 1999.

MARTIN, I. C. A. The deep-freezing of dog spermatozoa in diluents containing skim-milk. **Research in Veterinary Science**, v. 4, n. 2, p. 315-325, 1963.

MARTÍNEZ, A. P. Canine fresh and cryopreserved semen evaluation. **Animal reproduction science**, v. 82, p. 209-224, 2004.

MARTINS, L. F. S. **Métodos de criopreservação do sêmen canino (Revisão de literatura)**. Trabalho de Conclusão de Curso - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

MARTINS, M. I. M. **Efeito da sazonalidade sobre a função testicular de cães**. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu. 2005.

MESSIAS, C. **Algumas características do sêmen do cão após diluição e resfriamento**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. p.61, 2000.

OLIVEIRA NETO, F. A. **Efeito da adição de gema de ovo no diluente de Kenney para o resfriamento de sêmen ovino**. Tese (Doutorado). Universidade de São Paulo. p.74, 2012.

PIGNATARO, T. A. **Refrigeração do sêmen canino com diferentes diluentes e temperaturas de armazenamento**. Trabalho de conclusão de curso de graduação – Universidade de Brasília, Brasília. p.24, 2015.

PRAPAIWAN, N. *et al.* Low-density lipoprotein improves motility and plasma membrane integrity of cryopreserved canine epididymal spermatozoa. **Asian-Australasian journal of animal sciences**, v. 29, n. 5, p. 646, 2016.

PUGLIESI, G. **Viabilidade e fertilidade do sêmen equino resfriado a 5 C por 24 horas com dois diluidores**. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado em Zootecnia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. p.103, 2009.

ROTA, A.; STRÖM, B.; LINDE-FORSBERG, C. Effects of seminal plasma and three extenders on canine semen stored at 4 C. **Theriogenology**, v. 44, n. 6, p. 885-900, 1995.

ROWSON, L.E.A. Infertility of cow, sow and bitch. **Irish Veterinary Journal**, v.8, p.216-21, 1954.

SÁNCHEZ, A.; RUBILAR, J.; GATICA, Raul. Uso de la prueba hipoosmótica en la evaluación de la fertilidad potencial de semen canino fresco y congelado. **Archivos de medicina veterinaria**, v. 34, n. 1, p. 131-134, 2002.

SÁNCHEZ, R.; CARTAGENA, A.; BERLAND, O. Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. **Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú**, v. 17, n. 1, p. 01-07, 2006.

SANTOS, A.D.F; TORRES, C.A.A.; FONSECA, J.F. Uso do teste hiposmótico (HOST) para avaliar a congelabilidade do sêmen de caprinos das raças Alpina e Saanen, jovens e adultos, submetidos ao manejo com luz artificial. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 25, n. 3, 2001.

SANTOS, M. R. C.; ALMEIDA, L. E. F.; QUEIROZ, F. J. R. Meio extensor® para manutenção de sêmen canino resfriado em contêiner para transporte a longa distância. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 9, n. 2, 2002.

SILVA, A. R. **Criopreservação do sêmen canino diluído em tris: avaliação morfológica, funcional e de suas interações com oócitos homólogos**. Tese (Doutorado). Fortaleza, Ceará, Brasil. 2005.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. C. S.; DA SILVA, L. D. M. Comparação entre a água de coco em pó (ACP®) e o Tris como diluidores na criopreservação do sêmen de cães. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 6, p. 767-774, 2006.

SILVA, A. R. Atualidades sobre a criopreservação do sêmen de cães. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. Supl 1, p. 119-127, 2007.

SOUZA, J.A.T. **Estudo de algumas características do sêmen de cães da raça pastor alemão**. Dissertação de mestrado - Universidade de São Paulo, São Paulo, 1985.

UCHOA, D. C. **Água de coco em pó (ACP-106c) como diluente para conservação de sêmen e inseminação artificial na espécie canina**. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2011.

UCHOA, D. C.; *et al.* Criopreservação de sêmen e Inseminação Artificial em cães. **Ciência Animal**, v. 22, p. 132-142, 2012.



VERSTEGEN, J. P.; ONCLIN, K.; IGUER-OUADA, M. Long-term motility and fertility conservation of chilled canine semen using egg yolk added Tris-glucose extender: in vitro and in vivo studies. **Theriogenology**, v. 64, p. 720-733, 2005.